



⑬ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENTAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 42 08 923 A 1**

⑤ Int. Cl.⁵:
C 07 K 15/02
A 61 K 37/18
B 01 D 11/02

⑳ Aktenzeichen: P 42 08 923.9
㉔ Anmeldetag: 19. 3. 92
㉕ Offenlegungstag: 23. 9. 93

DE 42 08 923 A 1

㉚ Anmelder:
doNatur Dr. Kerek GmbH, 8000 München, DE

㉛ Vertreter:
Hansmann, A., Dipl.-Wirtsch.-Ing.; Vogeser, W.,
Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 81369 München; Boecker,
J., Dipl.-Ing. Dr.-Ing., Pat.- u. Rechtsanw., 6000
Frankfurt; Alber, N., Dipl.-Ing. Univ.
Dipl.-Wirtsch.-Ing. Univ; Strych, W., Dr.rer.nat.,
Pat.-Anwälte, 81369 München

㉜ Erfinder:
Kerek, Franz, Dr., 8000 München, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Antirheumatischer und antiphlogistischer Wirkstoff, Verfahren zu seiner Herstellung, diesen Wirkstoff
enthaltende Arzneimittel sowie deren Verwendung

⑤⑦ Beschrieben wird ein antirheumatischer und antiphlogisti-
scher Wirkstoff auf pflanzlicher und/oder bakterieller Basis,
der im wesentlichen ein Gemisch niedermolekularer, amino-
säurehaltiger Verbindungen ist. Die Charakterisierung dieses
Wirkstoffes, Verfahren zu seiner Herstellung, den Wirkstoff
enthaltende Arzneimittelzubereitungen sowie seine Verwen-
dung werden ebenfalls beschrieben.

DE 42 08 923 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 07. 93 308 038/400

10/57

Beschreibung

Die Erfindung betrifft antirheumatische und antiphlogistische Wirkstoffe gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 1, Verfahren zu ihrer Herstellung gemäß den Ansprüchen 5 und 7, antiphlogistisch und antirheumatisch wirkende Zubereitungen gemäß Anspruch 8 sowie die Verwendung dieser Wirkstoffe nach Anspruch 9.

Unter dem Begriff "Rheumatismus" werden an Bewegungs- und Stützorganen auftretende heterogene Krankheitsbilder teils entzündlicher, teils degenerativer Art mit unterschiedlicher Ätiologie und Pathogenese zusammengefaßt.

Rheumatische Erkrankungen sind eine heterogene, von den Symptomen her zu deutende, jedoch problematische und elastisch gehandhabte Krankheitsgruppe. Im Vordergrund der Symptomatik stehen der Schmerz und die Funktionsbehinderung am Bewegungsapparat, das sogenannte rheumatische Syndrom.

Die Therapie bei der Behandlung solcher Erkrankungen ist dabei auf

- Aufhebung bzw. Unterdrückung der Aktivität der rheumatischen Entzündung,
- Beseitigung oder Minderung der Schmerzen und
- Erhaltung und Besserung der Funktion des Bewegungsapparates gerichtet.

Trotz einiger Teilerfolge, insbesondere in der Therapie der symptomatischen Erscheinungen, wie Schmerz oder Entzündung, sind keine sowohl kausal wie auch symptomatisch wirkenden Antirheumatika ohne erhebliche Nebenerscheinungen bekannt.

Die sogenannten nicht-steroidalen Antirheumatika, wie Salicylate, Pyrazolone, Pyrazolidine, Indol-, Anthranilsäure- oder Phenylalkansäure-Derivate, haben zahlreiche Gemeinsamkeiten in ihrem symptomatischen Wirkungsprofil, jedoch auch bezüglich ihrer toxischen Nebenwirkungen. Länger dauernde Verabreichung von Salicylaten führen zu Magen- und Darmulcerationen. Ebenfalls bekannt ist die allgemeine Unverträglichkeit bei langzeitiger Verabreichung von Voltaren®, Ibuprofen® oder Indometacin®.

Auch die sogenannten steroidalen Antiphlogistika sind mit einer Reihe von schwersten Nebenwirkungen, wie Myopathie, Osteoporose, psychischen Störungen sowie erhöhter Infektionsanfälligkeit, belastet.

Ein weiterer Nachteil der "symptomatischen" Rheumatherapie besteht darüber hinaus darin, daß die therapeutischen Effekte eine ständige Arzneimittelgabe erfordern. Bei Unterbrechung oder Beendigung der Medikation treten üblicherweise die Krankheitssymptome wieder auf, die indirekt eine nichtkausale Lösung der Krankheitsursachen beweisen.

Für die Verbesserung oder Wiederherstellung der Funktion des Bewegungsapparates sind die wiederum symptomatisch wirkenden Neuraltherapeutika bekannt. Wegen der in letzterer Zeit gefundenen toxischen Metabolite erfordern die hier am meisten angewandten Lokalanästhetika, wie Xylin oder Procain, jedoch eine erhebliche Zurückhaltung.

Der größte Teil der Arzneimittel, die heute zur Behandlung der rheumatischen Krankheitsbilder eingesetzt werden, sind die sogenannten symptomatischen Antirheumatika, die entzündungshemmend (antiphlogistisch) — in der Regel auch mit Verminderung der Schmerzerscheinungen — wirken, ohne aber in die wahrscheinlich autoimmune Pathogenese der rheumatoiden Arthritis kausal eingreifen zu können.

Die heute als Basistherapeutika bekannten, vermutlich kausal wirkenden Antirheumatika — Immunsuppressiva und Cytostatika — weisen ein großes Risiko an Nebenwirkungen, wie Anämie, Leukopenie, Thrombozytopenie, hohe Infektionsanfälligkeit oder dergleichen, auf.

Wegen der wachsenden Bedenken gegen die Verwendung und die zum Teil nicht vorhersehbaren Nebenwirkungen dieser Mittel haben daher bei den von Rheumatismus befallenen Menschen und auch bei den Herstellern dieser Mittel dazu geführt, nach schonenden Mitteln zur Behandlung dieser Krankheiten zu suchen.

Aus dem Artikel von D.A. Lewis, Antiinflammatory Drugs from Plant and Marine Sources, Birkhäuser-Basel (1989), ist bekannt, daß einige Substanzen pflanzlicher Herkunft antiphlogistische Effekte aufweisen können. Der Wirkungsmechanismus konnte jedoch nur in einigen Fällen aufgeklärt werden und es wird vermutet, daß es zu einer Hemmung der Prostaglandin-Synthese kommt.

Aus der DE-A-25 51 962 ist die Verwendung eines Extraktes aus verschiedenen Spezies von Helleborus zur Behandlung verschiedener Formen hartnäckiger Algien bekannt, bei dem ein ethanolischer Totalextrakt eingesetzt wird.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, einen antirheumatischen und antiphlogistischen Wirkstoff auf pflanzlicher und/oder bakterieller Basis bereitzustellen, bei dem die vorstehend erwähnten Nebenwirkungen nicht auftreten, sowie ein Verfahren zur Herstellung solcher Wirkstoffe. Darüber hinaus liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, eine immunmodulatorisch, antiphlogistisch und neuraltherapeutisch wirkende pharmazeutische Zubereitung unter Verwendung dieses Wirkstoffes sowie die Verwendung dieser Wirkstoffe als Mittel zur Behandlung entzündlicher Erkrankungen bereitzustellen.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch die Merkmale der Ansprüche 1, 5, 7, 8 und 9 gelöst. Bevorzugte Weiterführungen der Erfindung sind den Unteransprüchen zu entnehmen.

Erfindungsgemäß enthält der Wirkstoff auf pflanzlicher und/oder bakterieller Basis im wesentlichen ein Gemisch niedermolekularer, aminosäurehaltiger Verbindungen, die eine schnelle und langdauernde therapeutische Wirksamkeit in 100- bis 1000-facher geringerer Dosierung als die bisher bekannten und verwendeten Arzneimittel und gleichzeitig gegenüber den bekannten Antirheumatika, Antiphlogistika sowie Neuraltherapeutika keine schädlichen Nebenwirkungen aufweisen, womit im Gegensatz zu den bisher bekannten Wirkstoffen eine kausale und somit auch langzeitige Wirkung ausgeübt wird, die hauptsächlich durch eine Wiederherstellung der normalen Immunmodulationsmechanismen erreicht wird.

Als für die Erfindung geeignete Pflanzen und Bakterien haben sich diejenigen erwiesen, die L-Rhamnose-Ver-

bindungen, wie Di- und Oligosaccharide, Polysaccharide, Flavonglykoside, Antocyane, Saponine und digitaloide Glykoside, enthalten. Als L-Rhamnose-haltige Di- und Oligosaccharide enthaltende Pflanzen sollen hier Pflanzen der Familie Rosaceae genannt werden, die Neohesperidose, Sophorabiose, Scillabiose, Rutinose, Robinobiose und Rhamninose enthalten. Geeignete rhamnosehaltige Polysaccharide sind zum Beispiel in Pflanzen der Gattung Echinacea und in Acacia sowie in Bakterien wie Salmonella paratyphi und Citrobacter enthalten. L-Rhamnosehaltige Phenolglykoside, Flavonglykoside, Antocyanoglykoside sowie Steroidglykoside finden sich bei den Rosaceae, Compositae, Labiatae, Rutaceae, Rhamnaceae, Violaceae, Liliaceae sowie den Ranunculaceae. Gypsophila struthium, Chlorogalum pomeridianum, Sarsaparilla radix sowie Dioscorea tokoro sind z. B. Vertreter L-Rhamnose-haltiger Saponine.

Als für die Erfindung besonders geeignete Pflanzen oder pflanzliche Zellkulturen haben sich Pflanzen, Pflanzenteile oder pflanzliche Zellen von Ranunculaceae gezeigt, insbesondere von Helleborus spec. Im wesentlichen besteht das niedermolekulare, aminosäurehaltige Gemisch aus Peptiden und/oder Glykopeptiden, wobei der nicht-peptische Anteil aus Zucker besteht und/oder laktonbildende Funktionsgruppen wie Uronsäuren enthalten kann. Gegen verdünnte Mineralsäuren wie 4%-ige Schwefelsäure ist das erfindungsgemäße Gemisch relativ stabil.

Als für die Erfindung besonders geeignete Wirkstoffe haben sich Gemische niedermolekularer, aminosäurehaltiger Verbindungen gezeigt, die ein Molekulargewicht von ca. 200 bis 30 000 D, insbesondere 300 bis 15 000 D, haben. Vorzugsweise beträgt das gelpermeationschromatographisch bestimmte Molekulargewicht unter 10 000 D. Peptide als solche oder an ein saccharidisches Gerüst gebundene Peptide oder Gemische der beiden haben sich als für die kausale und symptomatische Behandlung der Autoimmunkrankheiten und damit der Krankheitsbilder des rheumatischen Formenkreises als besonders geeignet gezeigt. Diese vorstehend genannte Stoffgruppe weist als wichtigste Aminosäurekomponenten relativ hohe Gehalte an Glutaminsäure, Glutamin, Asparaginsäure und Asparagin und/oder geringere Mengen an Leucin, Cystein, Tryptophan, Glycin und γ -Aminobuttersäure sowie Derivate der Glutaminsäure, wie Pyroglutaminsäure. In der Regel liegen die Molverhältnisse von 2 bis 10 Einheiten Glx (Glu und/oder Gln) pro Einheit an Asx (Asp und/oder Asn). Das erfindungsgemäße Gemisch aus niedermolekularen, aminosäurehaltigen Verbindungen enthält darüber Metalle, wobei neben einem überwiegenden Gehalt an Kalium sowie geringeren Mengen an Natrium, Magnesium und Calcium noch nachweisbare Gehalte an Schwermetallionen, wie Zn, Mn, Cu und/oder Fe, vorliegen. Diese Metallionen sind hauptsächlich an die freien Carboxygruppen der Peptidaminosäuren wie Glutamin und Asparaginsäure gebunden, wobei für die Schwermetallionen auch eine Chelatbindung an Peptidgruppen angenommen wird. Die Gehalte dieser Metalle schwanken von 5 bis 5000 ppm, insbesondere von 100 bis 3000 ppm, wobei die Unterschiede zwischen den einzelnen Metallen erheblich sein können und Kupfer in relativ geringen Mengen vorliegt.

Die erfindungsgemäßen niedermolekularen aminosäurehaltigen Verbindungen weisen darüberhinaus eine spezifische Affinität gegenüber saccharidischen Verbindungen, insbesondere gegenüber Deoxysacchariden, bevorzugt gegenüber L-Rhamnose-haltigen Verbindungen oder Rezeptoren, auf.

Erfindungsgemäß wird der Wirkstoff aus Pflanzen, pflanzlichen Zellkulturen oder Bakterienkulturen, bevorzugt aus L-Rhamnose-haltigen Arten, isoliert, wobei die Isolierung in an sich bekannter Weise erfolgt.

Aus verfahrenstechnischen Gründen — geringer apparativer Aufwand — wird das erfindungsgemäße Wirkstoffgemisch vorzugsweise aus getrocknetem Pflanzenmaterial isoliert. Dabei sind die Gehalte der Wirkstoffe von der Blütezeit der Pflanzen abhängig, wobei die maximalen Gehalte an Wirkstoff im wesentlichen im Herbst in der Wurzel und im Frühjahr in den Blättern zu finden sind. Das Verhältnis des Wirkstoffgehaltes zwischen Herbst und Frühjahr liegt dabei im Herbst deutlich höher als im Frühjahr. Als besonders geeignete Pflanzenmaterialien oder -teile haben sich die unterirdischen Teile der entsprechenden Pflanzen gezeigt, nämlich Wurzeln, Wurzelstöcke oder Rhizome. Neben getrocknetem Pflanzenmaterial kann selbstverständlich auch frisches Pflanzenmaterial verwendet werden, wobei die Ausbeute an dem erfindungsgemäßen Wirkstoffgemisch bei letzteren verringert ist, da im frischen Pflanzenmaterial ziemlich viele Enzyme enthalten sind, die zu einer unspezifischen Spaltung der niedermolekularen, aminosäurehaltigen Verbindungen führen und somit zu geringen Ausbeuten.

In einem ersten Schritt wird das getrocknete Pflanzenmaterial mit organischen Lösungsmitteln vorbehandelt, wobei die Verwendung apolarer organischer Lösungsmittel zu einer Entfettung und der Einsatz eines niederen Alkohols zur Vorextraktion erfolgt. Als geeignete apolare organische Lösungsmittel haben sich Hexan und Petrolether eines hohen Reinheitsgrades gezeigt. Im Bezug auf die Trockensubstanz werden diese in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:15, vorzugsweise von 1:5 bis 1:10 im Verhältnis Droge zu Lösungsmittel eingesetzt. Anschließend wird das entfettete Pflanzenmaterial mit einem Vorextraktionsmittel in Mengen von 1:3 bis 1:20, insbesondere von 1:4 bis 1:8 versetzt. Das erfindungsgemäße Vorextraktionsmittel ist in der Regel Diethylether, Ethylacetat, Chloroform oder Methanol oder ein Gemisch der vorstehenden Lösungsmittel, wobei der mengenmäßige Einsatz relativ unabhängig ist, Hauptsache ihre Menge ist ausreichend für den beabsichtigten Zweck. In der Regel als ausreichend haben sich die 5- bis 10fache Menge Vorextraktionsmittel, bezogen auf die Menge des entfetteten Pflanzenmaterials, erwiesen, wobei eine Mischung aus Methanol und Diethylether in einem Volumenverhältnis von 3:1 bevorzugt wird.

Die aus dem Entfettungs- und Vorextraktionsschritt erhaltene Droge wird anschließend mit einem wässrigen Extraktionsmittel extrahiert. In der Regel handelt es sich dabei um eine schwach basische Pufferlösung auf Basis von Natriumacetat oder Elektrophoresepuffer wie Tris/Glycin oder Tris/HCl eines pH-Wertes von 8 bis 9 oder neutrales oder schwach mit Ammoniak alkalisiertes Wasser einer Normalität von 0,001 bis 0,2 n. Gegebenenfalls kann das alkalisierte Wasser noch 0,1 bis 96% (V/V) eines Alkohols, vorzugsweise Ethanol oder n-Propanol eines hohen Reinheitsgrades enthalten. Das Verhältnis vorbehandeltes Pflanzenmaterial (Droge) des ersten Schrittes zu schwach basischer Pufferlösung oder alkalisiertem Wasser beträgt von 1:2 bis 1:40, vorzugsweise von 1:5 bis 1:20. Eine Extraktion mit neutralen oder mit 4 Gew.-% H_2SO_4 , 0,1 bis 1 N HCl, H_3PO_4 oder

HClO₄ schwach angesäuertem Wasser, das gegebenenfalls noch 0,1 bis 30% (V/V) der vorstehend genannten Alkohole enthalten kann, ist erfindungsgemäß ebenfalls vorgesehen, wobei das Verhältnis Droge zu Extraktionsmittel im wesentlichen der mit schwach basischem oder alkanisiertem Wasser durchgeführten Extraktion entspricht.

Eventuell im Rohextrakt vorliegende toxische Inhaltsstoffe, wie Bufadienolidglykoside, Hellebrin, Desglucosellebrin und/oder unwirksame Komponenten wie hochmolekulare Polysaccharide, z. B. Stärke, des Extraktes werden durch Dialyse, Elektrodialyse, kurzzeitige kontrollierte Säurebehandlung bei leicht erhöhter Temperatur oder durch Liquid-Solid-Adsorption entfernt. Zur Säurebehandlung wird dabei der Rohextrakt in der Regel mit 0,5 N H₂SO₄ über 0,5 bis 20 Minuten, vorzugsweise 2 bis 5 Minuten, bei 60 bis 100° C, bevorzugt um 80° C, behandelt, wobei die vorstehend genannten, die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen niedermolekularen, aminosäurehaltigen Verbindungen beeinflussende Verbindungen entfernt werden. Anschließend wird der so behandelte Rohextrakt mittels Neutralisationsmitteln, wie KOH, CaCO₃, NaOH, NH₃, auf einen pH-Wert um pH 6 neutralisiert und eingengt. Die Einengung der neutralisierten Lösung erfolgt dabei durch Eindampfen, Lyophilisieren oder ähnliche schonende Verfahrensweisen.

Der so erhaltene konzentrierte bzw. getrocknete Rohextrakt wird anschließend einer Vorbehandlung mit anorganischen oder organischen Verbindungen unterworfen, wobei ein Niederschlag entsteht, der die erfindungsgemäßen niedermolekularen, aminosäurehaltigen Verbindungen enthält. Als anorganisches Behandlungsmittel hat sich dabei Ammoniumsulfat in wäßriger Lösung und als organisches Behandlungsmittel ein organisches Lösungsmittel, vorzugsweise Aceton oder Ethanol, gezeigt, wobei bei Verwendung des organischen Lösungsmittels ein Verhältnis konzentrierter Rohextrakt zu Lösungsmittel von 1 : 1 bis 1 : 10, vorzugsweise 1 : 2 bis 1 : 8, geeignet ist.

Der durch Ammoniumsulfatprecipitation oder Acetonprecipitation erhaltene Niederschlag wird anschließend, in der Regel durch Zentrifugation, abgetrennt, erneut gelöst und mittels gängiger physikalischer Trennverfahren fraktioniert. Für das erfindungsgemäße Verfahren haben sich selektive Membrandialyse oder Gelfiltration als erfolgversprechend erwiesen, wobei der durch Zentrifugation abgetrennte Niederschlag vor der Auftrennung in Wasser gelöst wird. Bei der Auftrennung des in Wasser gelösten Niederschlags durch Gelfiltration haben sich Sephadex® G 10- oder G 25-Fraktionierungen als sehr geeignet erwiesen, wobei der Vorlauf, der die hochmolekulare Fraktion enthält, verworfen und die niedermolekularen Fraktionen gesammelt werden. Als Puffersysteme finden wäßrige Puffersysteme eines neutralen bis schwach sauren pH-Wertes Verwendung, wie Natriumacetatpuffer oder Tris/HCl-Puffer. Die bevorzugte Verwendung eines neutralen bis schwach sauren Puffersystems liegt dabei in der relativen Stabilität der niedermolekularen, aminosäurehaltigen Verbindung gegen Wasserstoffionen.

Die abgetrennten niedermolekularen Fraktionen werden anschließend durch Hyperfiltration unter Verwendung einer Membran unter Druck, durch HPLC, durch Ionenaustauschchromatographie mit NaCl-Gradienten und/oder Affinitätschromatographie mit L-Rhamnose-haltigen Festphasen weiter fraktioniert. Geeignete Filtrations- und/oder Affinitätsmedien sind Sephadex® G 10, Sephadex® G 25 oder epoxidaktiviertes oder ethylenoxidaktiviertes Sephadex® bzw. Sepharose®.

Die erhaltenen gereinigten Fraktionen wurden anschließend lyophilisiert, wobei weiße bis hellbraune Pulver erhalten werden, die gut löslich in Wasser und schwer löslich in organischen Lösungsmitteln, wie Aceton, Hexan oder Chloroform, sind.

Erfindungsgemäß ist auch vorgesehen, die Wirkstoffe oder das Wirkstoffgemisch auf peptidsynthetischem Weg herzustellen, wobei die Umsetzung bzw. Herstellung in an sich bekannter Weise mit Aminosäuren und/oder aminosäurehaltigen Ausgangsstoffen erfolgt.

Die auf die erfindungsgemäße Verfahrensweise erhaltenen erfindungsgemäßen niedermolekularen, aminosäurehaltigen Verbindungen zeigen in sehr geringen Dosen eine bemerkenswerte antiphlogistische und antirheumatische Wirkung. Zusätzlich zeigen sie eine starke Inhibition des alternativen Komplementweges und können sich an den MHC- oder Fc-Rezeptoren der Lymphozyten binden und dadurch eine spezifische, immunmodulierende Wirkung ausüben. Auch eine Normalisierung der erhöhten spontanen (SMCC) oder antikörperabhängigen zellulären Cytotoxizität (ADCC) der rheumatischen oder an erhöhter Autoaggressivität leidenden Patienten wird durch eine Wiederherstellung der normalen Suppressoraktivität erreicht. Überdies zeigen die erfindungsgemäßen Verbindungen durch ihre peptidischen Struktureinheiten spezifische Interaktionen mit den Immunzellrezeptoren, bevorzugt den MHC- und/oder Fc-Rezeptoren, wobei die Wechselwirkung von gewissen Deoxysacchariden, wie L-Rhamnose, beeinträchtigt wird.

Die erfindungsgemäßen niedermolekularen, aminosäurehaltigen Verbindungen können entweder getrennt als Reinsubstanz oder als Substanzgemisch oder in Form von pharmazeutischen Zubereitungen verabreicht werden, wobei Letztgenannte außer den erfindungsgemäßen Verbindungen noch einen und/oder mehrere pharmazeutisch unbedenkliche Hilfs- und/oder Trägerstoffe enthalten können. Als diese Stoffe seien hier 0,9%-ige physiologische Kochsalzlösung, 1 bis 5%-ige Glucoselösung, Mannit, Lactose, Kartoffelstärke, Carboxymethylcellulose Natrium, Talcum, Magnesiumstearat, Glycerin, Lanolin, Stearin, Natriumlaurylsulfat und Nipagin® genannt. Gegebenenfalls können den so hergestellten pharmazeutischen Zubereitungen auch noch weitere therapeutische Wirkstoffe oder Adjuvantien zugesetzt werden.

Diese Formulierungen schließen alle diejenigen Formulierungen ein, die für eine parenterale, einschließlich intramuskulärer, intravenöser, subkutaner, peri- oder intraartikularer Injektionen, eine perorale, wie Tabletten, Kapseln oder Tropfen, oder für eine äußere Anwendung, wie Salben, Cremes, Gele oder Suppositorien, geeignet sind. Auch homöopathische Arzneimittelzubereitungen mit den erfindungsgemäßen Verbindungen sind möglich.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Isolierung der niedermolekularen, aminosäurehaltigen Verbindungen

10 Teile getrocknete und pulverisierte Wurzel und Wurzelstock von *Helleborus purpurascens* (Familie Ranunculaceae) werden mit 100 Teilen Petrolether p.A. entfettet und anschließend mit 80 Teilen Ethylacetat vorextrahiert. Nach Entfernen des Extraktionsmittels wird der erhaltene Rückstand mit 100 Teilen 30% (V/V) Ethanol enthaltender 0,05 n Ammoniaklösung während 24 Stunden mazeriert. Dieser Rohextrakt wird dann bis etwa 1/8 seines Volumens eingeeengt und mit der fünffachen Menge Aceton p.A. versetzt, die Mischung über Nacht bei 0 bis 6°C gehalten und anschließend zentrifugiert. Der nach Zentrifugation erhaltene Niederschlag wird dann unter Verwendung einer Cellulosemembran gegen destilliertes Wasser während 72 Stunden dialysiert. Das Exdialysat wird erneut eingeeengt und mit Aceton p.A. behandelt. Die nach einmaliger oder wiederholten Fällungen erhaltenen niedermolekularen, aminosäurehaltigen Verbindungen werden in schwach basischer, 0,01 n Ammoniak enthaltender Lösung aufgenommen und einer Ionenaustauschchromatographie an einer NaCl-aktivierten DEAE-Cellulose mit einem HCOOH-Gradienten von 0,05 bis 0,1 M unterworfen.

Die gelchromatographisch mit Sephadex® G 10 bestimmten Molekulargewichte der niedermolekularen, aminosäurehaltigen Verbindungen liegen in einem Bereich von 300 bis 5000 Dalton, wobei das Vorliegen oligomerer Homologverbindungen berücksichtigt wurde.

Beispiel 2

Charakterisierung der niedermolekularen, aminosäurehaltigen Verbindungen

Die Identitätsbestimmung der niedermolekularen, aminosäurehaltigen Verbindungen wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von Kieselgel GF-254 Fertigplatten mit n-Propanol/Ethylacetat/Wasser im Verhältnis 60:10:30 als Laufmittel und Detektion mit Ninhydrin bzw. mit dem Chlortolidin-Reagenz nach Pataki durchgeführt.

Fehlende oder schwächere Farbreaktion mit Ninhydrin, aber rot-violett-farbige Flecken mit dem Chlor-o-Tolidin-Reagenz weisen auf das Vorhandensein von erfindungsgemäßen Verbindungen hin.

Die Stabilität der erfindungsgemäßen Verbindungen gegenüber Säurehydrolyse wurde mit 4 Gew.-%-iger Schwefelsäure bestimmt, wobei nach 20-minütigem Kochen in 4 Gew.-%-iger Schwefelsäure noch über 80% der erfindungsgemäßen Verbindungen unverändert vorliegen.

Die Aminosäurencharakterisierung wurde durch Hydrolyse mit 6 N HCl während 20 Stunden bei 105°C durchgeführt, wobei erhebliche Mengen an Glutaminsäure, Asparaginsäure, Glycin und γ -Aminobuttersäure identifiziert werden konnten. Das Verhältnis dieser Aminosäuren zueinander lag bei 10:2:1:1.

Beispiel 3

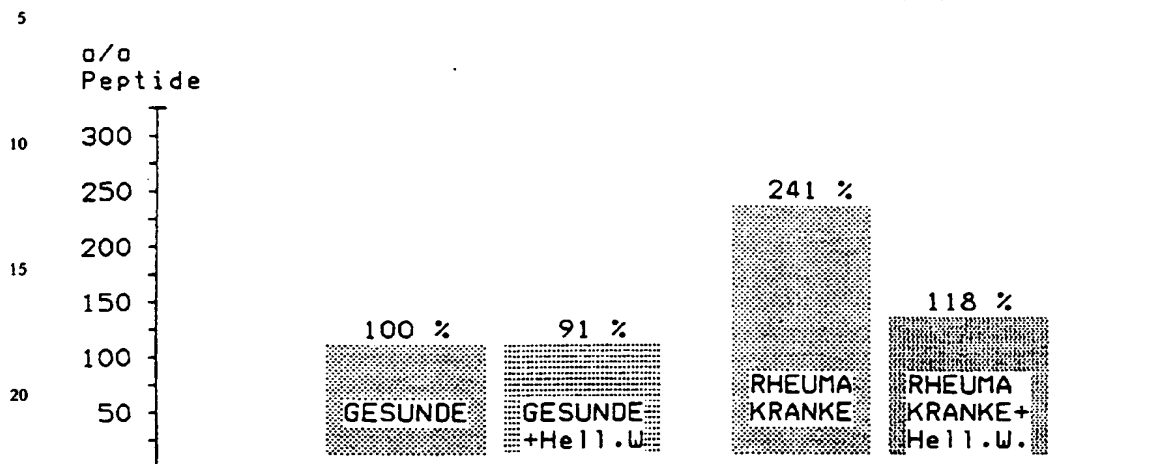
Immunmodulatorische Wirkung

Die gemäß Beispiel 1 erhaltenen niedermolekularen, aminosäurehaltigen Verbindungen wurden auf ihre immunmodulatorische Wirkung gemäß dem Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity-Test (ADCC-Test) der Killer-Zellen von gesunden bzw. rheumatischen Patienten getestet, wobei ein Verhältnis Killer-Zellen zu Effektor/Zielzellen von 10:1 eingehalten wurde.

Die Ergebnisse dieses Tests sind der nachfolgenden Abbildung zu entnehmen:

Abbildung 1

Mittelwerte der zellulären Cytotoxizität von 10 gesunden und 16 rheumatischen Patienten mit und ohne Zugabe der niedermolekularen, aminosäurehaltigen Verbindungen (HP)



Wie der vorstehenden Abbildung 1 zu entnehmen ist, führt die Zugabe von 0,1 bis 1,5 µg der erfindungsgemäßen Verbindungen pro kg zu einer deutlichen Hemmung der erhöhten Autoaggressivität der K-Zellen bei rheumatischen Patienten.

Beispiel 4

Antiphlogistische Wirkung

Die antiphlogistische Wirkung der gemäß Beispiel 1 hergestellten erfindungsgemäßen Verbindungen wurde mit dem dextraninduzierten Rattenpfotenödem-Test ermittelt. Die Ergebnisse dieses Tests sind der nachfolgenden Tabelle 1 zu entnehmen:

Tabelle 1

Statische Differenz (in %) zwischen den mit erfindungsgemäßen Verbindungen behandelten Ödemen und den unbehandelten Vergleichsödemen

	30 min	60 min	120 min	3 h
HP 1,2 µg/kg	14,0%	13,8%	27,3%	30,9%
Voltaren ^R 2,5 mg/kg		18,2%	29,8%	33,0%

Die Ergebnisse der Tabelle 1 verdeutlichen, daß bei Einsatz erfindungsgemäßer Verbindungen (HP) eine mit Voltaren[®] ähnliche antiphlogistische Wirkung erzielt wird, wobei diese Wirkung jedoch bei einer um den Faktor 2000 kleineren Wirkstoffdosis erreicht wird.

Beispiel 5

Die gemäß Beispiel 1 hergestellten erfindungsgemäßen Verbindungen wurden auf ihre antikomplementäre Wirkung an Human- und Meerschweinchen-Komplement auf dem klassischen und auf dem alternativen Weg untersucht (M. Smith et al., Int. Immunity, 38, 1279 (1982)).

Die Ergebnisse auf dem klassischen Weg zeigen, daß eine Hemmung nur bei 10 bis 40 µg/ml an erfindungsgemäßen Verbindungen eintrat. Bei dem alternativen Weg der Komplementkaskade dagegen wurde eine sehr starke und dosisabhängige Hemmung der erfindungsgemäßen Verbindungen gefunden.

Die Ergebnisse auf dem alternativen Komplementweg sind der nachfolgenden Tabelle 2 zu entnehmen:

Tabelle 2

Test der antikomplementären Wirkung

	Protein µg/ml	Reduktion der Hämolyse in %	5
Komplementsystem			
Alternativweg	15	22,3	10
	30	44,8	
	90	93,7	

Wie der Tabelle 2 zu entnehmen ist, zeigen die erfindungsgemäßen Verbindungen eine sehr starke antikomplementäre Wirkung auf dem Alternativweg und führen zu einer entsprechend effizienten Hemmung der inflammatorischen Prozesse.

Beispiel 6

25 Teile getrocknetes und pulverisiertes Kraut von *Adonis vernalis* (Familie Ranunculaceae) werden mit 150 Teilen Petrolether p.A. entfettet und anschließend mit 200 Teilen 0,05 n Ammoniak enthaltendes Wasser während 36 Stunden mazeriert. 100 Teile dieses filtrierten Rohauszuges werden eingeeengt und anschließend mit der fünffachen Menge an Ethanol p.a. versetzt, das Gemisch während 2 Tagen bei 3 bis 6°C gehalten und anschließend der entstandene Niederschlag abzentrifugiert. Der nach Zentrifugation erhaltene Niederschlag wird in einer ausreichenden Menge Wasser gelöst, filtriert und die vorstehende Ethanolfällung zweimal wiederholt. Die aus der wiederholten Fällung abgetrennten Niederschläge werden in einer geringen Menge Natriumacetatpuffer gelöst und durch Ultrafiltration über Folienmembranen (Firma Amicon, Lexington) die niedermolekularen Verbindungen von den hochmolekularen (MG \geq 20 000 Dalton) abgetrennt.

Durch Gelfiltration mit Sephadex® G 10 konnte das Molekulargewicht der niedermolekularen, aminosäurehaltigen Verbindungen mit 1500 bis 8000 Dalton bestimmt werden.

Die Charakterisierung sowie die immunmodulatorische, antiphlogistische sowie antikomplementäre Wirkung der gemäß Beispiel 6 isolierten erfindungsgemäßen niedermolekularen, aminosäurehaltigen Verbindungen war vergleichbar mit der Wirkung der erfindungsgemäßen Verbindungen gemäß Beispiel 1.

Beispiel 7

25 Teile getrocknete und pulverisierte Wurzel und Wurzelstock von *Helleborus orientalis* (Familie Ranunculaceae) werden mit 150 Teilen Petrolether p.A. entfettet und anschließend mit 100 Teilen Aceton/Diethylether in einem Vol-Verhältnis von 1:1 vorextrahiert. Nach Entfernung des Extraktionsmittels wird der Rückstand mit 150 Teilen 15% (V/V) Ethanol enthaltendes Wasser während 24 Stunden mazeriert und der Extraktionsschritt einmal wiederholt. Der erhaltene Rohextrakt wird auf eine mit 0,01 M Natriumacetat-Puffer equilibrierte Affinitätschromatographie-Säule aufgebracht. Als feste Phase kam mit Rutin behandelte epoxyaktivierte Sepharose® 6B zur Anwendung. Nicht absorbierte Verbindungen werden mit Startpuffer eluiert, die niedermolekularen, aminosäurehaltigen Verbindungen mit 0,25 M Essigsäurelösung desorbiert und die desorbierten Verbindungen mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung (60%) gefällt. Die nach einmaliger oder mehrmaliger Fällung mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung abgetrennten Verbindungen werden vereinigt und nach Lösung in der erforderlichen Menge des gleichen Puffers die hochmolekularen Bestandteile von den niedermolekularen Verbindungen durch Folienmembranen (Ausschlußgrenze \geq 20 000 Dalton) abgetrennt.

Die Molekulargewichte der niedermolekularen, aminosäurehaltigen Verbindungen wurden mit 300 bis 8000 Dalton mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie auf Sephadex® G 10 bestimmt.

Die Eigenschaften der erhaltenen niedermolekularen, aminosäurehaltigen Verbindungen waren vergleichbar mit den Eigenschaften der gemäß Beispiel 1 und 6 erhaltenen Verbindungen.

Patentansprüche

1. Antirheumatischer und antiphlogistischer Wirkstoff auf pflanzlicher und/oder bakterieller Basis, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Wirkstoff im wesentlichen ein Gemisch niedermolekularer, aminosäurehaltiger Verbindungen ist.

2. Wirkstoff nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Gemisch ein Molekulargewicht von 200 bis 30 000, einen relativ hohen Gehalt an Glutamin, Glutaminsäure, Asparagin und Asparaginsäure sowie geringere Gehalte an Leucin, Cystein, Tryptophan, Glycin und Derivaten der Glutaminsäure aufweist.

3. Wirkstoff nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Gemisch eine spezifische Affinität gegenüber Saccharidverbindungen aufweist.

4. Wirkstoff nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Gemisch carboxylgruppengebundene Metalle aufweist.

5. Verfahren zur Gewinnung eines Wirkstoffes nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet,

daß der Wirkstoff aus Pflanzen, pflanzlichen Zellkulturen oder Bakterienkulturen erhalten wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß

- a) getrocknetes Pflanzenmaterial mit organischen Lösungsmitteln vorbehandelt,
- b) das vorbehandelte Pflanzenmaterial mit einem wäßrigen Extraktionsmittel extrahiert,
- c) hochmolekulare und toxische Bestandteile unter Erhalt niedermolekularer, aminosäurehaltiger Verbindungen abgetrennt und
- d) die erhaltenen niedermolekularen, aminosäurehaltigen Verbindungen gereinigt werden.

7. Verfahren zur Gewinnung eines Wirkstoffes nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff durch Peptidsynthese aus Aminosäuren und/oder aminosäurehaltigen Ausgangsstoffen in an sich bekannter Weise hergestellt wird.

8. Antiphlogistisch und antirheumatisch wirkende Zubereitung, enthaltend einen Wirkstoff nach einem der Ansprüche 1 bis 4 und pharmazeutisch unbedenkliche Hilfs- und/oder Trägerstoffe.

9. Verwendung eines Wirkstoffes nach einem der Ansprüche 1 bis 4 als Mittel zur Behandlung von Phlogosis, Rheumatismus und Autoimmunkrankheiten.